



Recenzja

rozprawy doktorskiej mgra Mateusza Marcina Biegaja

pt. „*Morfogeneza układu pokarmowego oraz wpływu stosowanego rodzaju pokarmu na rozwój układu pokarmowego larwy ciosy *Pelecus cultratus* (L.) podchowiwanych w warunkach kontrolowanych*”

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Romana Kujawy z Katedry Rybactwa

Wydziału Bioinżynierii Zwierząt.

Przedstawiona do recenzji praca dotyczy badań wpływu różnych wariantów żywieniowych w podchowiu larw ciosy na ich parametry wzrostowe i przeżywalność oraz rozwój układu pokarmowego. Ciosa należy do rodziny ryb karpiowatych o ciekawej biologii. Jest to gatunek reofilny znoszący niewielkie zasolenia wody. Ryba ta jest wpisana do czerwonej księgi zwierząt zagrożonych. W Polsce zasięg występowania tego gatunku jest niewielki i ograniczony głównie do Zalewu Wiślanego. Podtrzymanie populacji tej ryby w polskich zbiornikach wodnych wymaga regularnego zarybiania. Aby wprowadzić do wód otwartych materiał zarybieniowy, musi być on wcześniej podchowiany w akwakulturze. Podchów młodocianych stadiów ryb wymaga optymalnych procedur pokarmowych, które dotychczas dla ciosy nie zostały precyzyjnie ustalone.

Doktorant w swojej rozprawie doktorskiej, w oparciu o podstawowe techniki histologiczne oraz histochemiczne, po raz pierwszy przeprowadził badania morfogenezy układu pokarmowego larw ciosy. Jako kontroli użył larw ciosy karmionych żywym pokarmem tj. larwami solowca. Następnie przeprowadził analizę wpływu różnych wariantów żywieniowych użytych w podchowiu larw ciosy na ich parametry wzrostowe oraz rozwój układu pokarmowego. W celu zrealizowania celów pracy Doktorant postawił trzy hipotezy badawcze, które w części eksperymentalnej projektu badawczego były skrupulatnie weryfikowane. Hipotezy zakładały, że rozwój układu pokarmowego ciosy jest zbliżony do rozwoju układu pokarmowego innych ryb karpiowatych: żywe larwy solowca stanowią najlepszy pokarm podczas wczesnego podchowu larw ciosy; odpowiednia dieta ma istotne znaczenie dla prawidłowej morfogenezy układu pokarmowego.

Formalny opis rozprawy

Wraz ze streszczeniem, piśmiennictwem obejmującym 78 pozycji literatury, spisem rycin (fotografii), tabel oraz wykresów, recenzowana praca liczy 89 stron tekstu. Układ pracy oraz podział nad rozdziały i podrozdziały jest bardzo klarowny i odpowiada standardom pracy naukowej. Zamieszczone w rozprawie doktorskiej fotografie wykonane w mikroskopie świetlnym oraz wykresy Doktorant opisał, jako rysunki. Jest to niepoprawna nomenklatura. Zdjęcia wykonane w mikroskopie świetlnym powinny być określane, jako „fotografie”, wykresy, jako „wykresy” itd.

Ocena merytoryczna

Wstęp jest wprowadzeniem w tematykę prowadzonych badań i dotyczy biologii ciosy, odżywiania, występowania i ochrony, korelacji żywienia ryb (*sensu lato*) z rozwojem układu pokarmowego. Wstęp rozprawy doktorskiej został przygotowany przez Autora wyczerpująco i interesująco. Rozdział ten, ściśle związany z tematem i celem pracy, Doktorant opracował bazując na doniesieniach z najnowszej literatury. Treści podrozdziałów części teoretycznej rozprawy doktorskiej są wyważone tematycznie i stopniowo wprowadzają czytelnika do zagadnień podejmowanych w części eksperymentalnej dysertacji.

Rozdział **Materiał i Metody** obejmuje opis warunków hodowli tarlaków, ich stymulację hormonalną oraz opis hodowli larw grupy kontrolnej ciosy karmionej larwami solowca (w tej części Doktorant nie podał stężenia MS-222, brak również procedury stymulacji hormonalnej tarlaków, stężenia oraz sposobu podawania preparatu).

Opis procedury histologicznej jest niekompletny i przed przygotowaniem wersji do publikacji powinien być uzupełniony. W każdej publikacji histologicznej, oprócz nazwy utrwalacza, należy podać czas utrwalania, płukania materiału. Nie używa się określenia „rząd alkoholowy” tylko np. wzrastający lub malejący szereg alkoholowy. Przed zatopieniem w parafinie materiał powinien być trzykrotnie prześwietlony w ksylenie, aby parafina mogła prawidłowo przesylić tkanki (tej informacji Doktorant nie podał). Procedura barwienia nawet, jeżeli jest procedurą podstawową i powszechnie stosowaną powinna być opisana szczegółowo, bądź powinien być podany odnośnik z literatury czy podręcznika technik histologicznych. Metoda PAS powinna być również opisana w szczegółach a skrót PAS (Periodic Acid and Schiff) powinien być rozwinięty.

W podrozdziale 2.2.1 Autor opisuje podchów larw ciosy z wykorzystaniem różnych wariantów żywieniowych. Doktorant wyklute larwy podzielił na grupy, które karmione były różnymi pokarmami w tym: artemią dekapulowaną, paszą Perla czy Gemma. Grupa kontrolna larw karmiona była

naupliusami solowca lub paszą Perla. Doktorant zastosował schemat żywieniowy z zamianą żywego pokarmu paszą komponowaną po 4, 8, 12 dniach podchowu larw ciosy. Zastanawia mnie w tym rozdziale tabela nr 2, gdzie Doktorant przedstawia skład procentowy składników znajdujących się w zastosowanych karmach tj. zawartość białka, tłuszczu węglowodanów, popiołu i fosforu. Czy analizy zawartości tych substancji była określona eksperymentalnie przez Doktoranta, czy dane te zostały dostarczone przez producenta? Taka informacja powinna była znaleźć się w rozdziale **Metody**.

Doktorant przeprowadził pomiary morfometryczne, a uzyskane wyniki poddał rozbudowanej analizie statystycznej w oparciu o program Statistica 13 i Microsoft Excel. Tak jak do części opisującej procedurę histologiczną miałam liczne zastrzeżenia, podrozdział opisujący procedurę morfometryczną i statystyczną jest napisany szczegółowo i nie budzi zastrzeżeń oraz świadczy, że w tej części badań Doktorant jest wysokiej klasy specjalistą. Zawarty w rozprawie schemat (Rys. 4) metod statystycznych przedstawia logikę zastosowanych metod statystycznych oraz ich zasadność.

Istotnym niedociągnięciem w rozdziale **Materiał i Metody** jest brak informacji dotyczących pozyskanych przez Doktoranta zgód: Lokalnej Komisji Etycznej oraz Regionalnego/Generalnego Dyrektora Ochrony Środowiska, które zezwalałyby Doktorantowi prowadzenie badań (dotyczy zgody na uśmiercanie larw powyżej 5 dnia rozwoju).

Wyniki rozprawy doktorskiej zostały podzielone na dwa główne podrozdziały zawierające dane dotyczące analiz morfometrycznych oraz histologicznych układu pokarmowego larw ciosy żywionych larwami solowca oraz analizy wpływu różnych wariantów żywieniowych na rozwój układu pokarmowego.

Opis histologiczny poszczególnych odcinków przewodu pokarmowego, zawarty w dysertacji, jest niekompletny i wymaga uzupełnienia. Doktorant zastosował również nieprecyzyjną nomenklaturę histologiczną.

- str. 23 „Na tym etapie śluzówka jamy gardzielowej była silnie wyścielona komórkami kubkowymi i utworzyła pierwsze fałdy”. Prawidłowy opis: śluzówka wyścielająca jamę gardzieli była bogata w komórki kubkowe. Brak również opisu, jakim nabłonkiem wyścielona jest jama gardzieli (u danio pręgowanego jest to nabłonek wielowarstwowy płaski nierogowaciejący), brak odniesienia do konkretnej fotografii (w dysertacji jest to fotografia nr 23).

- str. 25 „Charakterystyczną cechą budowy ściany przełyku jest gruba warstwa mięśni poprzecznie prążkowanych.” Na rycinach zamieszczonych w dysertacji (nr 17, 20) nie widzę mięśni poprzecznie prążkowanych w ścianie przełyku. U danio pręgowanego, podobnie jak u ssaków, w ścianie

początkowego odcinka przelyku obserwuje się mięśnie poprzecznie prążkowane. Pozostałe odcinki przelyku posiadają mięśnie gładkie. Podczas wczesnych etapów różnicowania się mięśniówki przelyku początkowo obserwowane są tylko mięśnie gładkie, które w późniejszych etapach rozwoju, w przednim odcinku, ulegają konwersji do mięśni poprzecznie prążkowych.

- w opisie jelita brak odnośników do dokumentacji fotograficznej
- str. 26 termin „tubule wątrobowe” zastosowany przez Doktoranta w opisie wątroby jest niepoprawny. Są to naczynia krwionośne otoczone hepatocytami tworzącymi sznury (na fotografii 29 obserwujemy zarówno przekroje podłużne jak i poprzeczne przez naczynia zatokowe otoczone hepatocytami).
- str. 27 „... widoczne były rejony wydzielania endogennego tzw. trzustki wysepkowe....” – pierwszy raz spotkałam się z takim terminem. Sądzę, że jest to jedynie błąd edytorski i Doktorant miał na myśli wysepki trzustkowe.
- w opisie fotografii Doktorant używa terminu „Przekrój wzdłużny...”. Zalecam używanie terminu – przekrój podłużny, zamiast stosowania kalki z języka angielskiego.
- fot. 22 „Z” w opisie zdjęcia Doktorant opisuje, jako warstwę rogowacającą – jest to w rzeczywistości nabłonek wielowarstwowy rogowacający.
- widzę niekonsekwencje w opisie trzustki i wątroby. W wynikach Doktorant napisał, że w wątrobie ciosy występują „tubule wątrobowe”. Natomiast w opisie fot. 27 Autor donosi, że „Komórki trzustki zorganizowane są podobnie jak wątroba – w zraziki”. *Nota bene* u danio pręgowanego wątroba nie wykazuje budowy zrazikowej. Doktorant na przekroju poprzecznym przez wysepkę trzustkową (fot. 27) zaobserwował zraziki. Nie nazwałabym układu komórek na obszarze wysepki Langerhansa zrazikami. Ta część z wiadomych przyczyn jest silnie unaczyniona, a komórki endokrynowe układają się liniowo wzdłuż naczyń krwionośnych.
- str. 27 „Ściana pęcherza żółciowego zbudowana była z nabłonka jednowarstwowego cylindrycznego podobnie jak ściana przewodu żółciowego”. Pęcherz kojarzy mi się bardziej z moczowym, natomiast pęcherzyk z żółciowym. Ściana pęcherzyka żółciowego wyścielona jest nabłonkiem jednowarstwowym cylindrycznym a nie ściana zbudowana jest z nabłonka. Na rycinie 24 nie widzę ściany pęcherzyka żółciowego. Natomiast pęcherzyk żółciowy widoczny jest na rycinie 23. W ścianie pęcherzyka obserwowane są mięśnie gładkie widoczne na ryc. 23.

Polecam Doktorantowi bardzo przydatną pozycję literaturową “The zebrafish atlas of macroscopic and microscopic anatomy” autorstwa Joseph A. Holden ,Lester L. Layfield, Cambridge (<https://doi.org/10.1017/CBO9781139198431.005>).

Kolejny rozdział **Wyników** dotyczy analizy wpływu stosowanego pokarmu na rozwój układu pokarmowego ciosy. Z dużą przyjemnością czytałam ten podrozdział. Tabele i wykresy (choć bardzo miniaturkowe) umieszczone w tej części dysertacji porządkują uzyskane wyniki. Wnikliwa analiza morfometryczna oraz rozbudowana analiza statystyczna pozwoliła Doktorantowi na uzyskanie ciekawych wyników. Pomimo pewnych niedociągnięć w opisie histologicznym układu pokarmowego tę część rozprawy oceniam wysoko. Wyniki są imponujące i wskazują na ogrom pracy, jaką Doktorant włożył w ich uzyskanie.

Prawidłowo i jasno wyznaczony cel pracy oraz właściwie zastosowane technik badawczych pozwoliły Doktorantowi na uzyskanie interesujących wyników o wartości poznawczej i aplikacyjnej. W przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej do najważniejszych osiągnięć stanowiących o walorach naukowych pracy Pana mgra Biegaja zaliczyć należy wnioski wynikające z wyników uzyskanych w dysertacji:

- Etapy rozwoju układu pokarmowego larw ciosy wykazują cechy, obserwowane u innych ryb karpowatych;
- Larwy solowca (podobnie jak u innych karpowatych) są najlepszym pokarmem w początkowych okresach rozwoju larw ciosy;
- Pokarm o dużej zawartości białka i niskiej zawartości tłuszczu jest nieodpowiedni w podchowcie larw ciosy podczas wczesnych etapów rozwoju (duża zawartość białka w paszy wpływa negatywnie na tempo wzrostu larw oraz wybranych elementów układu pokarmowego);
- Stan zaawansowania rozwoju układu pokarmowego nie przekłada się na wielkość ciała ryb (masa i długość całkowita) natomiast rodzaj pokarmu wpływa na tempo rozwoju układu pokarmowego);
- Wzrost larw ciosy zależy bezpośrednio od zrównoważonej zawartości lipidów i białka w paszy a nie od cech fizycznych pokarmu.

Dyskusja jest bardzo dobrze napisaną częścią rozpraw. Doktorant płynnie odnosi się uzyskanych przez siebie wyników, umiejętnie dyskutując je w oparciu o dane literaturowe. Pozytywnie oceniam pomysł przedstawienia tabeli porównującej główne etapy rozwoju pokarmowego ze względu na rodzaj odżywiania pomiędzy wybranymi gatunkami ryb reofilnych. Rozprawę kończą **Posumowanie i wnioski**, które są raczej zwięzłym (w postaci sześciu punktów) podsumowaniem uzyskanych wyników niż rzeczywistymi wnioskami. Elementów wniosków można dopatrzeć się w ostatnim punkcie tego rozdziału.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pana mgra Mateusza Marcina Biegaja ma wartość poznawczą poszerzając wiedzę dotyczącą wpływu różnych wariantów żywieniowych na rozwój układu pokarmowego larw ciosy. Ze względu na zagrożenie tego gatunku w Polsce, proces zarybiania krajowych zbiorników wodnych ciosy wymaga specjalistycznego przygotowania narybku w warunkach laboratoryjnych. Wyniki uzyskane przez Doktoranta mają charakter aplikacyjny i niewątpliwie przyczynią się do optymalizacji podchowu larw ciosy poprzez najtrafniejszy i zoptymalizowany dobór pokarmu. Doktorant poprawnie zdefiniował cele badawcze, podjął właściwe kroki do ich zrealizowania i umiejętnie przedyskutował uzyskane wyniki w oparciu o doniesienia literaturowe.

Rolą recenzenta jest przede wszystkim rzetelna ocena rozprawy, stąd tak duża liczba uwag i komentarzy krytycznych, ale chciałabym podkreślić, że nie umniejszają one mojej pozytywnej oceny rozprawy jako całości. Doceniam również ogromny wysiłek, jaki włożył Doktorant przygotowując materiał do analizy histologicznej. Pomimo, że sama analiza i interpretacja otrzymanych wyników budziła zastrzeżenia, sądzę, że moje uwagi wzbogacą tę część rozprawy, która zapewne będzie w przyszłości opublikowana.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska pt. „Morfogeneza układu pokarmowego oraz wpływu stosowanego rodzaju pokarmu na rozwój układu pokarmowego larwy ciosy *Pelecus cultratus* (L.) podchowiwanych w warunkach kontrolowanych” spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim. W mojej ocenie rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789). Biorąc pod uwagę powyższe, przedkładam wniosek do Rady Naukowej Dyscypliny zootechnika i rybactwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego o dopuszczenie mgra Mateusza Michała Biegaja do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Małgorzata Daczewska